

⑬日本国特許庁
公開特許公報

⑭特許出願公開
昭53—137198

⑮Int. Cl.²
G 01 N 27/46
G 01 N 33/16

識別記号

⑯日本分類
113 D 13
113 E 6

庁内整理番号
6621—23
7363—23

⑰公開 昭和53年(1978)11月30日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑱生物化学センサー用電極

⑲特 願 昭52—51736
⑳出 願 昭52(1977)5月7日
㉑発 明 者 鈴木周一
東京都豊島区巣鴨1—40—6
同 軽部征夫

立川市富士見町4—11—18
㉒出 願 人 鈴木周一
東京都豊島区巣鴨1—40—6
同 軽部征夫
立川市富士見町4—11—18
㉓代 理 人 弁理士 相良省三

明 細 書

1 発明の名称 生物化学センサー用電極

2 特許請求の範囲

陽極および陽極液を内蔵し、外部液と接触するための通路を有し、固定化微生物、固定化生理活性物質などをその膜面に密着できる露出した白金陰極を有する生物化学センサー用電極

3 発明の詳細な説明

本発明は生物化学センサー用電極に関する。

本発明の目的は微生物や酵素などの生理活性物質の反応により生成される電極活物質および電荷を電気化学的に検知するための装置を提供するにある。

電極活物質とは陽極または陰極においてその電極上で比較的容易に電子授受を行なう物質である。陽極における電極活物質である酸素を検知する酸素電極は溶存酸素計として種々の形式のものがすでに市販されているが、本発明のように微生物や生理活性物質の反応

により生成される陰極における電極活物質の検知を目的とする電極は全く知られていない。

陰極における電極活物質としては微生物により生成される水素、ヤ酸、エタノール、アンモニア、硫化水素などが知られている。また酵素などの生理活性物質により生成されるものとしては上記物質以外にNAD、FMN、FADなどの還元型の補酵素や色素類が知られている。これらの電極活物質は陰極上で還元されて電子を放出し、この電子を陽極が受けとり陽極は還元され、回路に電流が流れる。

このような生物化学反応を利用した生物化学反応電池については本発明者らがすでに約15年前から基礎的研究を続けており、その電極反応の機構を明らかにしている。

通常このような電池システム用装置としてはH形のガラスやプラスチックのセルが用いられている。

本発明者らはこの生物化学反応電池システムを、各種有用生理活性物質や腐水のBOD

などの計測に適用できることを見出した。しかし試料液中に電極を浸漬することにより目的物質を連続的に検知する生物化学センサー用電極としては、上記通常のH形電池セルではその形状が不適当である。

そこで本発明者らは試作実験を繰り返した結果、全く新しい生物化学センサー用電極を発明するに至った。

すなわち、本発明は陽極および陽極液を内蔵し、外部液と接触するための液絡を有し、固定化微生物、固定化生理活性物質などをその表面に密着できる導出した白金陰極を有する生物化学センサー用電極を提供する。

以下、本発明の生物化学センサー用電極の形状、特長について具体的に説明する。

第1図に本発明の電極の一例を示す。第1図において、1は例えばアクリル樹脂などのプラスチック類やガラスなどでつくられた円筒状セル、2は白金板陰極、3は液絡（例えばアニオン交換樹脂膜）、4は陽極（例えば

過酸化銀）、5は陽極液（例えばリン酸緩衝液）を示す。

固定化微生物あるいは固定化生理活性物質は、2の陰極表面を被覆するようにO-リングなどを用いて1の円筒状セルの外壁に固定化する。

なお本発明の電極は2の表面に固定化物を付着させない場合でも、たとえば微生物培養液にこれを浸漬することにより電気化学的バイオアッセイ用電極としても使用できる。

液絡に使用する膜としてはイオン交換樹脂、セラミックなどの電気的に低抵抗の隔膜を用いる。また陽極としては過酸化銀の代りに塩化銀、二酸化鉛などの金属酸化物や炭素などを使用できる。

実施例 (1)

陰極として半径1.4cmの円板状白金電極、陽極として1cm×4cmの過酸化銀電極、液絡としてアニオン交換膜の1種であるセレミオン(AMV型、旭ガラス社製)、陽極液とし

て0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用い、第1図のような電極を構成した。

別に常法に従ってグルコースを選択的に氧化するシュウドモナス・フルオエツセス(*IFO3081*)を含有させたコラーゲン膜(微生物膜)を調製した。これを上記電極の陰極表面に付着させ、その上にナイロン製ネットをかぶせO-リングを用いて円筒状セル外壁に固定化した。

このようにして製作した(微生物膜で被覆した)電極をグルコース溶液中に浸漬すると、下表に示したような電流値が得られた。すなわちグルコースを液中の微生物が氧化することにより、生成した電極活性物質が白金陰極で反応し電流値が得られることが示された。そして、その電流値とグルコース濃度との間には比例関係があることがわかった。

従つて、この微生物膜で被覆した電極を用いて電流値を測定すれば、上記のグルコース濃度との比例関係から、未知濃度のグルコー

ス溶液中のグルコース濃度を容易に計測できる。

表 1

グルコース濃度(μM)	電流値(μA)※
20	4.4
40	3.9
50	3.3
60	3.0
70	2.6
80	2.2

※ 30℃、電極を挿入してから15分後の定常電流値

実施例 (2)

実施例(1)で試作した電極にアルコールデヒドロゲナーゼを含有させたコラーゲン膜を実施例(1)と同様に被覆固定化させた。この酵素膜で被覆した電極をエタノールとNADを含む試料液中に浸漬した結果、エタノール濃度に対応する電流値が得られた。すなわち膜中のアルコールデヒドロゲナーゼによつてエタ

ノールがアセトアルデヒドに酸化される際に補酵素の NAD が $NADH$ に還元され、これが白金陰極上で反応し電流値が得られた。

得られる電流値とエタノール濃度との関係を下表に示す。

このように上記電極は酵素膜で被覆することにより酵素膜センサーとして使用できることがわかる。

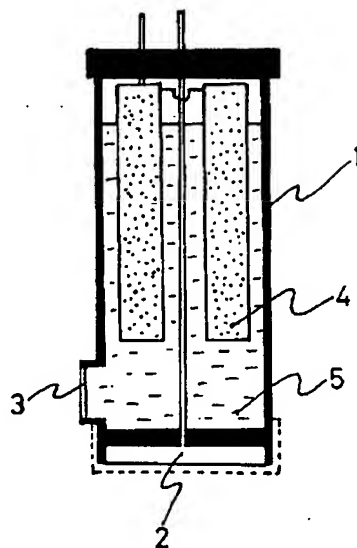
表 2

エタノール (mM)	電流値 (μA)※
2.5	50
1.0	100
1.2	120
1.5	150
1.7	170
2.0	200

※ 25℃、10分間の定常電流値

4 図面の簡単な説明

第1図は本発明の電極の一例を示す概略図である。



第1図

Translation of Japanese Reference

1. Title of the Invention: ELECTRODE FOR BIOCHEMICAL SENSORS

5 2. Claims

An electrode for a biochemical sensor, comprising a cathode and a cathode solution, a liquid junction for the contact with an outer solution, and an exposed platinum anode, on the surface of which an immobilized microorganism, an immobilized bioactive substance, and the like can be attached closely.

10

3. Detailed Description of the Invention

The present invention relates to electrodes for biochemical sensors.

An objective of the present invention is to provide a device for electrochemically detecting electrode active substances and electric charge that are generated by the reaction of microorganisms, bioactive substances such as enzymes.

15

An electrode active substance refers to a substance that can transfer electrons relatively easily on the surface of anode or cathode. Various types of oxygen electrodes, which detect oxygen, a cathode active substance, are already commercially available as dissolved oxygen monitors. However, there is no known electrode for detecting an anode active substance that is generated by the reaction of microorganisms or bioactive substances as disclosed in the present invention.

20

Known anode active substances include hydrogen, formic acid, ethanol, ammonium, and hydrogen sulfide, which are generated by microorganisms. Known anode active substances generated by bioactive substances such as enzymes include, in addition to the above substances, reduced forms of coenzymes such as NAD, FMN, and FAD, and pigments. These electrode active substances are oxidized on the anode, releases electrons, which are received by the cathode and thereby reducing the cathode, and thus electric current is generated in the circuit.

25

The present inventors have been conducting basic studies on such biochemical batteries utilizing biochemical reactions for about 15 years, and clarified the mechanism for the electrode reaction.

30

Normally, an H-shaped cell made of glass or plastic is used in devices for such battery systems.

The present inventors discovered that this biochemical battery system could be used for measuring a variety of useful bioactive substances, BOD of wastewater, etc. However, the shape of normal H-shaped battery cells as described above is not suitable as an electrode for biochemical sensors, which continuously detects a target substance by immersing the electrode

35

in sample solutions.

Therefore, the inventors repeated trial experiments and finally invented a completely novel electrode for biochemical sensors.

Thus, the present invention provides an electrode for biochemical sensors comprising a cathode and a cathode solution, liquid junction for contact with outer solutions, and an exposed platinum electrode, on the surface of which an immobilized microorganism, an immobilized bioactive substance, or the like is closely attached.

The configuration and characteristics of the electrode for biochemical sensors of the present invention are specifically described below.

Fig. 1 illustrates an example of the electrode of the present invention. In Fig. 1, the numbers represent as follows: 1. cylindrical cell made of glass, plastic such as acrylic resin, or such; 2. platinum anode; 3. liquid junction (for example, anion exchange resin membrane); 4. cathode (for example, silver peroxide); and 5. cathode solution (for example, phosphate buffer).

Immobilized microorganisms or bioactive substances are immobilized to the outer wall of the cylindrical cell 1 using o-rings and the like to cover the surface of the anode 2.

The electrode of the present invention without immobilized materials attached to the surface of the anode 2 can also be used as an electrode for electrochemical bioassays, for example, by immersing the electrode in culture solution of microorganisms.

The membrane used for the liquid junction may be a membrane of low electrical resistance such as ion exchange resin, ceramic, etc. The cathode may be an oxidized metal such as silver chloride or lead dioxide, or carbon, instead of silver peroxide.

Example (1)

An electrode as shown in Fig. 1 was made using a disc-shaped platinum electrode with a radius of 1.4 cm as an anode, silver peroxide electrode of 1 cm x 4 cm as a cathode, Selemion (type AMV, Asahi Glass Co.), a kind of anion exchange membrane as a liquid junction, and 0.1 M phosphate buffer [pH 7.0] as cathode solution.

Collagen membrane (microorganism membrane) containing *Pseudomonas fluorescence* (IFO3081), which catabolizes glucose selectively, was prepared separately according to the standard method. The membrane was attached to the anode surface of the above electrode, covered with nylon net, and immobilized on the outer wall of the cylindrical cell using o-rings.

When the above electrode (coated with the microorganism membrane) was immersed in glucose solution, the electric current values as shown in the following table were obtained. The results indicated that as the microorganism in the membrane catabolized glucose, electrode active substances were generated and reacted with the platinum anode, and electric current was generated. Moreover, there was found to be a proportional relationship between the electric

current and the glucose concentration.

Thus, by measuring the electric current using the electrode covered with the microorganism membrane, the unknown glucose concentration of a glucose solution can be measured easily based on the above proportional relationship between the electric current and the glucose concentration.

Table 1.

Glucose concentration (μM)	Electric current (μA)*
20	44
40	39
50	33
60	30
70	26
80	22

* Value of constant electric current at 30°C obtained 15 min after inserting the electrode

10 Example (2)

Collagen membrane containing an alcohol dehydrogenase was used to cover the electrode made in Example (1) and immobilized as described therein. When this electrode covered with the enzyme-immobilized membrane was immersed in sample solutions containing ethanol and NAD, electric currents corresponding to the ethanol concentrations were obtained. That is, upon the oxidation of ethanol to acetaldehyde by the alcohol dehydrogenase in the membrane, coenzyme NAD was reduced to NADH, which then reacted on the platinum anode to generate the electric current.

The relationship between the electric current and ethanol concentration is shown in the following table.

20 Thus, the above electrode covered with an enzyme membrane can be used as an enzyme-membrane sensor.

Table 2.

Ethanol (mM)	Electric current (μA)*
25	50
10	100
12	120
15	150

17	170
20	200

* Value of constant electric current for 10 min at 25°C

Brief Description of the Drawings

5 Fig. 1 is a schematic diagram showing an example of the electrode of the present invention.

1. Cylindrical cell (made of plastic or glass, for example)
2. Platinum anode
3. Liquid junction (anion exchange resin membrane, for example)
4. Cathode (silver peroxide, for example)
- 10 5. Cathode solution (phosphate buffer, for example)

[Fig. 1]

